Untersuchungen über den Nachweis der alkalischen Leukocytenphosphatase der Maus in Blutleukocyten, in Leukocyten aus Tumoraszites und bei eitriger Peritonitis

Peter Goldbrunner

1962

AUS DEM
PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

Untersuchungen über den Nachweis der alkalischen Leukocytenphosphatase der Maus in Blutleukocyten, in Leukocyten aus Tumoraszites und bei eitriger Peritonitis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Goldbrunner
aus München

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv. Doz. Dr. A. GEORGII
Correferent:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 8. OKT. 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

IN TIEFER DANKBARKEIT

MEINEN LIEBEN ELTERN

Durch Entwicklung histochemischer Untersuchungsmethoden wurde die morphologische Beurteilung von Einzelzellen bedeutend erweitert. Histochemische Nachweisverfahren ermöglichen die Beobachtung von Funktionsänderungen der Zelle durch morphologische Auswertung. Bei allen Funktionsänderungen der Zelle müssen Fermente eine wesentliche Rolle einnehmen, da sie das biologische Geschehen im Organismus steuern. Unter der Vielzahl der Fermente ist die alkalische Phosphatase der Leukocyten für hämatologische Untersuchungen von Interesse geworden, weil es sich gezeigt hat, dass ihre Aktivität in den Blutleukocyten bei einzelnen Erkrankungen auffallend verändert ist. Durch die unterschiedliche Konzentration des Fermentes in den Leukocyten können einzelne Krankheitsgruppen von einander unterschieden werden. Diese Eigenarten des histochemisch nachweisbaren Phosphatasegehaltes ermöglichen neben der morphologischen Beurteilung der Zelle auch eine Beurteilung der Funktion des blutbildenden Gewebes.

Der Ausdruck Phosphatasen ist grundsätzlich ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Fermenten, deren Wirkungsprinzip die hydrolytische Abspaltung von Phosphatverbindungen oder Phosphorsäure aus organischen oder auch anorganischen Verbindungen ist. Beispielsweise werden aus Phosphorsäureestern verschiedener Alkohole und Phenole durch Phosphatasen die Phosphorsäuren abgespalten; die Fermente müssen dann als Phosphoesterasen bezeichnet werden. Dagegen wird in Pyrophosphatverbindungen die P-O-P Bindung gespalten, weshalb diese Fermente als Polyphosphatasen von den Phosphoesterasen in der Biochemie unterschieden werden. Der Wirkungsbereich von Phosphoesterasen und Polyphosphatasen ist demnach sehr weit und natürlich im Intermediärstoffwechsel der Kohlenhydrate und bei der Phosphorylierung von grosser Bedeutung. Die morphologische Darstellung der Phosphatase ist durch histochemische Nachweismethoden möglich, die vorwiegend auf dem Substratangebot von Glycerophosphat oder Naphthylphosphat beruhen. In histochemischen Nachweismethoden werden Phosphoesterasen und Polyphosphatasen ohne Unterschied erfasst; deshalb muss vom Nachweis des Fermentes unspezifische Phosphatase gesprochen werden. Auch bezüglich der Reaktionsbereitschaft in unterschiedlichen pH-Bereichen sind die Fermente zu unterteilen. In hämatologischen Untersuchungen ist allein die Fermentgruppe der alkalischen Phosphatase von Bedeutung geworden.

Zunächst soll die Lokalisation der alkalischen Phosphatase in den weissen Blutzellen besprochen werden. Erstmalig wies KAY (1929) (23) auf die vielseitige und aktive Ausstattung der Leukocyten mit Fermenten hin. Der erste Nachweis alkalischer Phosphatase in Leukocyten gelang ROCHE (40) wenig später. Im selben Jahr konnte UMENO (50) durch biochemische Methoden die Phosphatase-Aktivität in einer Suspension von Leukocyten im Aszites beim Kaninchen messen. Die Lokalisation der alkalischen Phosphatase ist ausschliesslich auf das Cytoplasma der Zelle beschränkt. KAPLOW (22) sowie PLUM (36) bezeichnen Phosphataseniederschläge im Kern als

Kunstprodukt. BOIVIN und ROBINEAUX (3) halten die phosphatasepositiven Granula für den Ort der Enzymreaktion.

Weiter ist zu erwähnen, in welcher Form der Leukocyten die alkalische Phosphatase enthalten ist. Hauptträger der alkalischen Phosphatase sind die neutrophilen Granulocyten; Lymphocyten, Monocyten und eosinophile und basophile Granulocyten sind phosphatasenegativ (WACHSTEIN 55, HAIGHT und ROSSITER (20); MERKER und HEILMEYER 29, MEISLIN und Mitarbeiter 28, SAUER und RAUSCH-STROOMANN 41). Die erste Form in der Reifungsreihe der Granulocyten mit positivem Phosphatasegehalt sind die Metamyelocyten (FRIEDERICI 13). Die Menge der Granula steigt mit zunehmendem Alter der Leukocyten. WACHSTEIN (55) vermutet, dass die Fermentaktivität schon im Knochenmark erworben wird, was RABINOVITCH und ANDREUCCI (37) in ihren Untersuchungen nicht bestätigen. Durchaus nicht alle granulierten oder segmentkernigen Zellen der myeloischen Reihe enthalten Phosphatase. Es ist vielmehr nur ein kleiner Teil aller Zellen vom Metamyelocyten bis zum segmentkernigen phosphataseaktiv, während die Mehrzahl, bei manchen Menschen fast alle Granulocyten phosphatasenegativ sein können (KAPLOW 22, KERPPOLA 24).

Der bereits erwähnte auffallende Unterschied in der Konzentration der alkalischen Leukocytenphosphatase bei gewissen Blutkrankheiten wurde besonders durch die Befunde von WACHSTEIN (55) herausgestellt. Er hat als erster den Fermentschwund in den neutrophilen Granulocyten bei chronischer myeloischer Leukämie beschrieben. Die Ergebnisse seiner Arbeiten wurden von PLUM (36), WILTSHAW und MOLONEY (59); KAPLOW (22), KOCH und REMY (25); MEISLIN und Mitarbeiter (28) bestätigt. VALENTINE und BECK (52) kamen bei biochemischen Untersuchungen zu ähnlichen Feststellungen. Einen bemerkenswerten Anstieg der Phosphataseaktivität der Granulocyten fand WACHSTEIN (55) bei Leukocytosen im Verlauf von Infektionskrankheiten. WILTSHAW und MOLONEY (59) sowie VALENTINE und BECK (52) konnten diese morphologisch-histochemischen Ergebnisse durch biochemische Untersuchungen erhärten. Auch bei sogenannten leukämoiden Reaktionen, das sind Krankheitsbilder mit leukämieartigen Blutveränderungen bei bekannter Ursache der Hyperleukocytose, ist der Gehalt an alkalischer Leukocytenphosphatase vermehrt (SAUER und RAUSCH-STROOMANN 41; VALENTINE und BECK 52; MEISLIN und Mitarbeiter 28). WACHSTEIN (55) führt diese Befunde auf eine starke Erhöhung des Anteils an segmentkernigen Granulocyten zurück. PLUM (36) erklärt den vermehrten Gehalt an Leukocytenphosphatase bei der echten polycythämie ebenfalls mit der Hyperleukocytose. Über den erhöhten Phosphatasegehalt der Granulocyten bei leukämoiden Blutveränderungen infolge Fibrosen und Sklerosen der Knochenmarksräume haben insbesondere KOCH und REMY (25) berichtet.

Die erwähnten Aktivitätsunterschiede der alkalischen Leukocytenphosphatase bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wurden für den klinisch tätigen Arzt ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel. Dies vor allem deshalb, weil die morphologische Auswertung der Blutbilder bei der gestaltlichen Vielfalt der

Blutkrankheiten oft sehr schwierig ist. Eine der wichtigsten Feststellungen war deshalb (WACHSTEIN 56), dass ein Fehlen der alkalischen Phosphatase in den reifen Granulocyten von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie der einzige Hinweis ist, ausgeschwemmte leukämische Zellen von normalen Granulocyten zu unterscheiden. WILTSHAW und MOLONEY (59) fanden, dass morphologisch anscheinend gleiche Zellen bezüglich ihrer Fermentaktivität deutlich differieren können. Sie verwendeten dabei neben histochemischen auch biochemische Nachweismethoden, die besonders von VALENTINE (52, 53) und BECK (1) entwickelt wurden. KOCH und REMY (25) haben die Bedeutung des Phosphatasegehaltes für die Differentialdiagnose zwischen echten myeloischen Leukämien und leukämoiden Reaktionen besonders hervorgehoben. In letzter Zeit untersuchten BRESSEL u.a. (4) den Phosphatasegehalt der Leukocyten bei retikulären und lymphatischen Systemerkrankungen und bei der Lymphogranulomatose. Sie fanden eine starke Streuung des Gehaltes an alkalischer Leukocytenphosphatase bei der Lymphogranulomatose und bei den retikulären Systemerkrankungen. Diese können deshalb differentialdiagnostisch von der chronischen Lymphadenose nur bedingt abgegrenzt werden. Es ist demnach trotz aller positiven Feststellungen zu betonen, dass biochemische ebenso wie histochemische Befunde bei einer Reihe hämatologischer Krankheiten so unterschiedlich und zuweilen sogar widersprechend sind, dass sie für eine differentialdiagnostische Beurteilung nicht verwendet werden können.

Bei experimentellen Untersuchungen über die Abgrenzung der durch virushaltige Geschwulstfiltrate erzeugten Myelosen von unspezifischen Hyperplasien des blutbildenden Gewebes unter dem Bild der leukämoiden Reaktion ergab sich die Frage, ob auch an der Maus durch den Gehalt der alkalischen Phosphatase der Leukocyten entscheidende, die Abgrenzung ermöglichende Unterschiede auftreten können. Die Durchsicht des Schrifttums über den Phosphatasegehalt der Leukocyten bei der Maus ergab keine sicheren Angaben. Lediglich WACHSTEIN (55) bemerkt im Rahmen seiner Untersuchungen über die alkalische Phosphatasenaktivität der Leukocyten im Blut und im Knochenmark des Menschen, dass die weissen Blutzellen von Kücken, Maus und Hund keine Phosphatase enthalten. Auch NOWELL und Mitarbeiter (32) erwähnen im Zusammenhang mit ihren Untersuchungen über die Transplantation von Ratten-Knochenmarkszellen auf röntgenbestrahlte Mäuse, dass die Leukocyten im peripheren Blut und im Knochenmark der normalen Maus phosphatasefrei sind. Die Arbeiten über Phosphatase der Maus von GÖSSNER (17), MEYER und WILLIAMS (30); BIESELE und WILSON (2) sowie YASUDA und Mitarbeiter (61, 62) betreffen nur die Gewebsphosphatase in verschiedenen Organen und Tumoren der Maus.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb versucht, mit den üblichen Verfahren zur histochemischen Darstellung der alkalischen Leukocytenphosphatase bei der Maus entsprechende Fermentaktivitäten nachzuweisen und in Analogie zu den menschlichen Erkrankungen Unterschiede zwischen myeloischer Leukämie, leukämoider Reaktion und normalem Blut zu finden.

NACHWEISMÖGLICHKEITEN DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE

Für den Nachweis der alkalischen Phosphatase in den Leukocyten des peripheren Blutes stehen biochemische und histochemische Methoden zur Verfügung. Die biochemische Methode hat den Vorteil, dass der Gehalt an alkalischer Phosphatase sämtlicher Granulocyten zusammen, die in einer bestimmten Menge Blut enthalten sind, quantitativ genau erfasst werden kann. Demgegenüber steht der Nachteil einer komplizierteren Durchführung. Im Rahmen unserer Untersuchungen am Blut der Maus musste aber nicht deswegen auf den biochemischen Nachweis verzichtet werden, sondern weil dazu die Abtrennung der weissen Blutkörperchen von den roten notwendig ist und für die üblichen Trennungsmethoden (SZILARD 45, BUCKLEY 5, SPEAR 44) mindestens 6-10, z.T. sogar 20 ml Blut benötigt werden. Es hätten demnach für einen einzigen Versuch 10 Mäuse verblutet werden müssen, da sich aus einer verbluteten Maus bestenfalls 1 ml Blut gewinnen lässt.

Es wurde also mit histochemischen Methoden gearbeitet. Sie zeichnen sich aus durch einfachere Technik und ermöglichen einen Einblick in die Vorgänge der einzelnen Zelle. Das dürfte auch ausschlaggebend dafür sein, dass bei den Untersuchungen über die alkalische Leukocytenphosphatase der histochemische Nachweis bevorzugt verwendet wird, wie sich aus dem einschlägigen Schrifttum ersehen lässt (BOIVIN und ROBINEAUX 3; BRESSEL, WITTE, HENNING 4; CRAM und ROSSITER 7; FRIEDERICI 13, GÖSSNER 17, GOMORI 18, HAIGHT und ROSSITER 20; KAPLOW 22, MAEDA und OSHIMA 27, MERKER und HEILMEYER 29; PLENERT 35, PLUM 38, TAKEUCHI und UTSUNOMIYA 47; TRUBOWITZ und Mitarbeiter 48; WACHSTEIN 55, 56, WACHSTEIN und MEISEL 57).

A. CALCIUM-COBALT-METHODE
(Succedan-Verfahren)

Mit der Calcium-Cobalt-Methode gelang GOMORI (18) und gleichzeitig TAKAMATSU (46) 1939 erstmals die histochemische Darstellung alkalischer Phosphatase. Die Technik dieses histochemischen Nachweises beruht darauf, histologische Schnitte oder Ausstrichpräparate im ersten Arbeitsgang mit Glycerophosphat bei alkalischem Milieu und Anwesenheit von Calcium-Salzen zu inkubieren. Am Ort der Fermentwirkung fällt dann das freiwerdende Phosphorsäureion als schwerlösliches farbloses Calciumphosphat aus. In einem zweiten notwendigen Arbeitsgang, der zur Bezeichnung Succedanverfahren führte, wird dann das farblose Calciumphosphat in schwarzes Cobaltsulfid oder metallisches Silber übergeführt. Durch Modifikationen dieses Verfahrens wird versucht, eine möglichst genaue Enzymlokalisation zu ermöglichen: Sie bestehen in einer Erhöhung des Calciumchloridgehaltes in der Inkubationslösung (FRIEDERICI 13, GOEBEL und PUCHTLER 16; GOMORI und BENDITT 19), Verkürzung der Inkubationszeit (BOIVIN und ROBINEAUX 3;

Blutkrankheiten oft sehr schwierig ist. Eine der wichtigsten Feststellungen war deshalb (WACHSTEIN 56), dass ein Fehlen der alkalischen Phosphatase in den reifen Granulocyten von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie der einzige Hinweis ist, ausgeschwemmte leukämische Zellen von normalen Granulocyten zu unterscheiden. WILTSHAW und MOLONEY (59) fanden, dass morphologisch anscheinend gleiche Zellen bezüglich ihrer Fermentaktivität deutlich differieren können. Sie verwendeten dabei neben histochemischen auch biochemische Nachweismethoden, die besonders von VALENTINE (52, 53) und BECK (1) entwickelt wurden. KOCH und REMY (25) haben die Bedeutung des Phosphatasegehaltes für die Differentialdiagnose zwischen echten myeloischen Leukämien und leukämoiden Reaktionen besonders hervorgehoben. In letzter Zeit untersuchten BRESSEL u.a. (4) den Phosphatasegehalt der Leukocyten bei retikulären und lymphatischen Systemerkrankungen und bei der Lymphogranulomatose. Sie fanden eine starke Streuung des Gehaltes an alkalischer Leukocytenphosphatase bei der Lymphogranulomatose und bei den retikulären Systemerkrankungen. Diese können deshalb differentialdiagnostisch von der chronischen Lymphadenose nur bedingt abgegrenzt werden. Es ist demnach trotz aller positiven Feststellungen zu betonen, dass biochemische ebenso wie histochemische Befunde bei einer Reihe hämatologischer Krankheiten so unterschiedlich und zuweilen sogar widersprechend sind, dass sie für eine differentialdiagnostische Beurteilung nicht verwendet werden können.

Bei experimentellen Untersuchungen über die Abgrenzung der durch virushaltige Geschwulstfiltrate erzeugten Myelosen von unspezifischen Hyperplasien des blutbildenden Gewebes unter dem Bild der leukämoiden Reaktion ergab sich die Frage, ob auch an der Maus durch den Gehalt der alkalischen Phosphatase der Leukocyten entscheidende, die Abgrenzung ermöglichende Unterschiede auftreten können. Die Durchsicht des Schrifttums über den Phosphatasegehalt der Leukocyten bei der Maus ergab keine sicheren Angaben. Lediglich WACHSTEIN (55) bemerkt im Rahmen seiner Untersuchungen über die alkalische Phosphatasenaktivität der Leukocyten im Blut und im Knochenmark des Menschen, dass die weissen Blutzellen von Kücken, Maus und Hund keine Phosphatase enthalten. Auch NOWELL und Mitarbeiter (32) erwähnen im Zusammenhang mit ihren Untersuchungen über die Transplantation von Ratten-Knochenmarkszellen auf röntgenbestrahlte Mäuse, dass die Leukocyten im peripheren Blut und im Knochenmark der normalen Maus phosphatasefrei sind. Die Arbeiten über Phosphatase der Maus von GÖSSNER (17), MEYER und WILLIAMS (30); BIESELE und WILSON (2) sowie YASUDA und Mitarbeiter (61, 62) betreffen nur die Gewebsphosphatase in verschiedenen Organen und Tumoren der Maus.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb versucht, mit den üblichen Verfahren zur histochemischen Darstellung der alkalischen Leukocytenphosphatase bei der Maus entsprechende Fermentaktivitäten nachzuweisen und in Analogie zu den menschlichen Erkrankungen Unterschiede zwischen myeloischer Leukämie, leukämoider Reaktion und normalem Blut zu finden.

geschützt, was die genaue und daher unerlässliche Betrachtung der Ausstriche mit Immersion ermöglicht.

Während wir das Calcium-Cobalt-Verfahren von GOMORI nur gelegentlich anwendeten, benützten wir in der Regel die einfachere und zuverlässigere Azofarbstoffmethode. Sie ist allen GOMORI-Modifikationen überlegen, wie besonders PLENERT (35) nachgewiesen hat. Er konnte zeigen, dass die Spaltungsgeschwindigkeit des Naphthylphosphats beim Azokupplungsverfahren weit höher ist als die des Glycerophosphats bei der GOMORI-Methode trotz maximaler Mg-Ionen Aktivierung.

Für den Ausschluss unspezifischer Reaktionsprodukte, die mit Phosphatasegranula verwechselt werden konnten, wurden bei jeder Untersuchung Blindversuche angelegt, wobei entweder nach Hitzeinaktivierung oder in substratlosem Medium inkubiert wurde. Kontrolluntersuchungen zum positiven Nachweis der alkalischen Leukocytenphosphatase wurden an Ausstrichen von Menschen- oder Rattenblut vorgenommen, die gleichzeitig mit dem Mäuseblut untersucht wurden. Verwendet wurden nur solche Präparate, die nicht älter als 24 Stunden waren. Knochenmarksausstriche wurden sofort nach Tötung der Tiere angefertigt. In der Zählweise gingen wir über die von KAPLOW (22) angegebene Norm von 100 hinaus und prüften nach einem Vorschlag von MERKER und HEILMEYER (29) 300, teilweise sogar 500 Zellen auf ihren Gehalt an alkalischer Phosphatase. Es werden 300 oder 500 neutrophile stab- und segmentkernige Granulocyten im Ausstrich aufeinanderfolgend ausgezählt und nach der Stärke ihrer Reaktion einem System mit den Stufen 0-5 zugeordnet. Die Anzahl der Zellen in jeder Stufe wird mit dem entsprechenden Klassenfaktor multipliziert. Summiert man die daraus entstehenden Produkte, so ergibt sich die Aktivitätszahl des Ausstrichs. Da immer auf 100 Zellen berechnet wird, muss bei Auszählung von mehr als 100 Zellen der Durchschnittswert durch Mittelung bestimmt werden. Es können also Werte auftreten zwischen 0 (keine Zelle ist phosphataseaktiv) und 500 (alle gezählten Neutrophilen erreichen die höchste Aktivitätsstufe 5). Der Normalbereich für die Leukocyten des menschlichen Blutes liegt zwischen 10 und 100 (MERKER und HEILMEYER 29).

Klassifizierung der phosphataseaktiven neutrophilen Granulocyten nach KAPLOW (22)

0 = Keine Reaktion.
1 = Diffus leicht braun.
2 = Gelegentliche Zusammenballung von braunschwarzen Ausfällungen.
3 = Homogen verteilte Niederschläge in der ganzen Zelle. Zelle noch transparent.
4 = Ungleich verteilte schwarze Granularausfällungen. Die Transparenz schwindet.
5 = Einheitlich tiefschwarze Farbstoffausfällungen, welche die ganze Zelle ausfüllen. Keine Transparenz mehr. Zellkern zum Teil überlagert.

Tiergut

Das untersuchte Tiergut umfasste weisse Inzuchtmäuse des Agnes-Bluhmstammes, der am Institut gehalten wird, sowie Händlermäuse, die von einer weissen Inzuchtmaus des Rockefeller-Institutes abstammen. Das Untersuchungsgut war auf männliches und weibliches Geschlecht gleichmässig verteilt. Die Ernährung bestand aus Getreidekörnern, war also kohlenhydratreich, was allgemein für den Gehalt der Zellen an alkalischer Phosphatase wahrscheinlich von Bedeutung ist (persönliche Mitteilung von J. LINDNER).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. NORMALMÄUSE

Zunächst wurden normale Mäuse untersucht. Der Unterschied von Alter und Gewicht musste besonders berücksichtigt werden, weil jüngere Lebewesen grundsätzlich eine andere Fermentausstattung als ausgewachsene zeigen (RICHTERICH 39). Die ausgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

TABELLE 1

Anwendung der beiden Phosphatasenachweise an Normalmäusen mit Aufgliederung nach Abkunft, Alter und Gewicht

Tierzahl	Stamm	KAPLOW		GOMORI	Alter		Gewicht	
		Blut	Kn.M.	Blut	unter 6 Mon.	über 6 Mon.	unter 25 g	25 g - 41 g
50	AB, H^o	50			50		50	
12	AB	12				12	12	
10	H.	10	10	10	10		10	
10	H.	10				10		10
82		82	10	10	60	22	72	10

H^o = Händlermäuse

In der verwendeten KAPLOW-Methode dient während der Inkubation Propandiol als Puffer und Fast Blue RR als Diazoniumsalz, entsprechend den Angaben von KAPLOW (22). Um eventuelle Artefakte oder Hemmwirkungen einer Fixierungsart auszuschliessen, benützten wir neben der üblichen Methylalkohol-Formalin-Fixierung (30 Sek.) auch eine reine Formolfixierung der Ausstriche durch Formalindampf (7-8 Min.). Ausserdem wurden unterschiedliche Inkubationstemperaturen (4^o - 25^oC) und Inkubationszeiten (10 - 60 Min.) sowie der Einfluss unterschiedlichen pH-Mi-

lieus der Puffer (8,0 - 9,75) geprüft.

Neben den genannten Unterschieden der Fixierung und Inkubation wurden in einer zweiten Versuchsreihe (17 Mäuse) die Farbstoffe und Puffer gewechselt. Folgende Farbstoffe wurden ausser Fast Blue RR verwendet: Fast Garnet GBC (KAPLOW bei PEARSE 34), Fast Violet B, sowie die von GÖSSNER (17) und von LINDNER, VON SCHWEINITZ, FREITAG (26) empfohlenen Salze Variaminblau B conc. und Echtrot ITR. Neben dem erwähnten Puffer Propandiol wurden auch Veronalnatrium und TRIS (Hydroxymethylaminomethan) benützt.

Bei diesen Untersuchungen versuchten wir auch, durch zugeführte Mg-Ionen die Reaktion zu aktivieren. Nach PLENERT (35) sowie TRUBOWITZ (48) und Mitarbeiter sind die Mg-Ionen für die Funktion der alkalischen Phosphatase unentbehrlich weil sie als Aktivator neben dem Coferment in den Ferment-Eiweisskörper eingebaut werden (Tabelle 2). Bei den mit einem° bezeichneten 12 Präparaten wurden die Diazoniumsalz- und Substratkonzentrationen variiert, weil besonders bei geringer Enzymaktivität Hemmungserscheinungen auftreten können, wenn deren Konzentrationen zu hoch sind. Die Verwendung von zu wenig Farbstoff führt dagegen zu Diffusionsartefakten (GÖSSNER 17, LINDNER u.a. 26).

Es ist besonders hervorzuheben, dass die in der 2. Tabelle aufgeführten 50 Ausstriche von 17 Tieren (Händlermäuse) stammen, die über 6 Monate alt und schwerer als 25 g waren.

TABELLE 2

Variationen der Nachweismethode nach KAPLOW
durch Änderung der verwendeten Diazoniumsalze und des Puffers
sowie Aktivierung durch Mg-Ionen.

unter-	Farbstoffe					Puffer			
suchte Ausstriche	Fast Blue RR	Variamin-Blau B	Echtrot ITR	Garnet GBC	Fast Violet B	Propandiol	Veronalnatr.	TRIS	Mg^{++}
12°	12						12		
2				2		2			
4	4						4		4
3				3				3	
8		8					8		
11			11				11		
10					10		10		
50	16	8	11	5	10	2	45	3	4

° bei diesen Ausstrichen wurden die Farbstoff- und Substratkonzentrationen variiert.

Ergebnis I

Trotz zahlreicher Variationen der Methode und des Untersuchungsgutes gelang keine Darstellung von alkalischer Phosphatase in den Leukocyten des peripheren Blutes und des Knochenmarks der normalen Maus.

Das Ergebnis, dass Leukocyten der gewöhnlichen weissen Maus keine nachweisbare Phosphatase enthalten, sollte durch weitere Untersuchungen erhärtet werden. Dazu wurde ein Untersuchungsgut herangezogen, bei dem auf Grund der erwähnten Beobachtungen der Klinik menschlicher Erkrankungen die alkalische Phosphatase sicher vermehrt ist.

II. LEUKÄMOIDE REAKTIONEN

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die experimentelle Erzeugung leukämoider Reaktionen (GEORGII 14, GEORGII, DEWES, BÜNTIG 15) durch Zufuhr von homologem Organeiweiss wurde der Nachweis von alkalischer Phosphatase am peripheren Blut der Mäuse versucht. In den bis zu 4 Wochen dauernden Versuchen entwickelten sich durch tägliche Fremdeiweissinjektionen bei den Mäusen hohe Leukocytosen. Von 20 solcher Tiere wurden vom Beginn der Versuche bis zu deren Tötung die Leukocyten auf ihren Phosphatasegehalt untersucht. Vom peripheren Blut jeder Maus wurden zweimal wöchentlich Ausstriche angefertigt. Nach der Tötung wurden Knochenmarksausstriche für jeden der beiden Phosphatasenachweise hergestellt. Insgesamt wurden 233 Blut- und Knochenmarksausstriche sowie dazugehörige Blindversuche überprüft. (Tabelle 3)

TABELLE 3

Aufgliederung der untersuchten Präparate von den 20 Tieren mit den beiden Phosphatasenachweisen

Methode	Zahl der Ausstriche	
	Blut	Knochenmark
KAPLOW	180	20
GOMORI	18	15

Ergebnis II

In diesen Versuchen wurden periphere Hyperleukocytosen bis zu 65 000 beobachtet und im Differentialblutbild eine Verschiebung der Granulopoese zu den unreifen Formen gefunden. Auch bei stärkster Leukocytenvermehrung wurde keine alkalische Phosphatase nachgewiesen. Weder im peripheren Blut noch in den Leukocyten des Knochenmarks wurde die typische Granulierung des Cytoplasma gefunden; mit den gleichen Reagentien wurde in Leukocyten des Menschen und der Ratte der positive Phosphatasenachweis erreicht.

III. LEUKOCYTOSEN NACH CORTISONGABEN

Der Gehalt an alkalischer Leukocyten-Phosphatase ist von der Aktivität der Nebennierenrinde abhängig (VALENTINE und Mitarbeiter 54). Bei "Stress-Lagen", wie akuten Infektionen, Blutungen, Infarkten und auch nach Operationen findet sich eine Erhöhung des Phosphatasegehaltes. Durch Cortison liess sich der Phosphatasegehalt binnen 3 Tagen steigern und fiel 72 Stunden nach Beendigung der Einspritzungen langsam wieder ab (VALENTINE und Mitarbeiter 54). VACCARI, SABOTTO und MANZINI (51) erzielten den gleichen Effekt, indem sie durch Injektionen von Formalin einen Schock hervorriefen.

Methode

Der Phosphatasegehalt bei Stress-Situationen durch Cortisonzufuhrt wurde mit der KAPLOW-Methode untersucht. 4 Mäusen wurde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Tageszeit Prednisolon ("Solu-Decortin pro infantibus", Merck) subcutan gespritzt, 5 mg in 1/2 ccm Aqua dest. Das periphere Blut wurde an den 3 Versuchstagen wie folgt entnommen:

Maus	I	3	Std.	post	injektionem
"	II	6	"	"	"
"	III	9	"	"	"
"	IV	24	"	"	"

Schliesslich wurde auch zwei Tage nach der 3. Cortisoninjektion allen vier Mäusen Blut abgenommen. Eine 5. Maus bekam nur einmal Cortison und wurde 2 1/2 und 4 Tage später untersucht. Das Gewicht der Mäuse lag zwischen 35,3 und 40,0 g, sank jedoch bei allen 5 Tieren am 4. Tag nach der ersten Injektion.

Ergebnis III

Auch in diesen Versuchen war in den Granulocyten des peripheren Blutes keine alkalische Phosphatase nachweisbar, obwohl ein Anstieg der Granulocyten auf 40 000 /mm^3 anzeigte, dass durch die Prednisolonzufuhr eine reaktive Hyperleukocytose erzielt wurde.

IV. LEUKOCYTEN IM MÄUSE-ASZITES-TUMOR

Nach RICHTERICH (39) beobachtet man in Einzelfällen beim Menschen ein Übertreten der alkalischen Phosphatase des Serums aus dem Gefässystem in die Pleura- oder Aszitesflüssigkeit. LINDNER u.a. (26) fanden eine positive Phosphatase-Reaktion an Tumorasziteszellen von Ratten und Mäusen in vivo (Durchflusskammer). Deshalb wurde der Aszitestumor von Mäusen untersucht. Aszitesausstriche von 18 Tumormäusen mit dem Impftumor Sa I wurden zusammen mit den Ausstrichpräparaten ihres peripheren Blutes nach der KAPLOW-Methode geprüft; Aszi-

tesausstriche von 4 Tumormäusen wurden zur Kontrolle zugleich mit dem GOMORI-Verfahren untersucht. Auch in diesem Versuch wurden mehrere Farbstoffe getestet, um eventuelle Reaktionsunterschiede zu erfassen (Tabelle 4).

TABELLE 4

Variationen des verwendeten Farbstoffes und Puffers
im Rahmen der KAPLOW-Methode bei Untersuchungen am MAT Sa I.

Tierzahl	Farbstoffe				Puffer		Zahl d. unters. Ausstriche
	Fast Blue RR	Variamin Blau B	Echtrot ITR	Fast Violet B	Propandiol	Veronalnatrium	
5		5				5	5
3	3					3	3
2			2	2		4	4
5	5				5		5
3		3	3			6	6
18	8	8	5	2	5	18	23

Ergebnis IV

Sowohl bei der KAPLOW-Methode als auch beim GOMORI-Verfahren wurde in Ausstrichen von Aszites ein Gehalt an alkalischer Phosphatase gefunden, dessen Intensität in der Klassifizierung nach KAPLOW (2?) sowie nach MERKER und HEILMEYER (29) bei Stufe 4 und 5 liegt. Dieser Phosphatasegehalt betrifft die Tumorzellen. Gleichzeitig liess sich in diesen Untersuchungen erstmals auch ein Phosphatasegehalt der Leukocyten nachweisen. Er war allerdings schwächer als der der Tumorzellen, seine Intensität entsprach den Stufen 2 und 3.

Bei diesen Untersuchungen wurde keine Blutzellenfärbung der Ausstriche als Gegenfärbung angewendet. Sie wurde unterlassen, weil dadurch die genaue Klassifizierung gestört wird, denn die Fermentreaktionsprodukte werden oft überdeckt und sind nicht mehr in ihrer ganzen Ausdehnung zu verfolgen. Für eine sichere qualitative Unterscheidung von Tumorzellen und Leukocyten wurde in einigen Präparaten die Gegenfärbung der Kerne verwendet. Es ist deshalb gesichert, dass nicht nur Tumorzellen, sondern auch die segmentkernigen Granulocyten Phosphataseniederschläge zeigen. Die besten Ergebnisse brachte die Verwendung der Diazoniumsalze Fast Blue RR und Variaminblau B conc., während Echtrot ITR und Fast Violet B nicht verwendbar waren.

Neben den phosphatasepositiven Granulocyten des Tumoraszites fanden sich bei den gleichen Tieren im peripheren Blut wiederum völlig negative Leukocyten, obwohl auch hier periphere Leukocytosen bis zu 50 000 bestanden. In allen Präparaten wurden jeweils 500 Zellen ausgewertet.

V. LEUKOCYTEN IN DER EITRIGEN PERITONITIS

Aus der Feststellung, dass in Granulocyten von Mäuse-Aszitestumor alkalische Phosphatase nachgewiesen wurde, ergab sich die Frage, ob dies allen in den Peritonealraum ausgetretenen Leukocyten zukommt oder ob das Ferment nur bei Leukocyten des Tumoraszites in nachweisbarer Menge vorhanden ist. Deshalb wurden unspezifische Leukocytenexsudationen durch eitrige Peritonitis erzeugt. Nach PAWLOWSKY (33) und WALLGREEN (58) führt die Infektion mit Streptokokken, Staphylokokken oder Pneumokokken am sichersten zur eitrigen Peritonitis.

Methode

8 Mäusen wurde eine Streptokokken-Kultur in verschiedenen Verdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 1024 und in Mengen von 0,02 ccm - 1,0 ccm intraperitoneal gespritzt. Nach 1-3 Tagen wurden die Tiere getötet, und mit dem Objektträger direkt Abstriche von den Eingeweiden gemacht oder die Bauchhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, die gewonnene Flüssigkeit zentrifugiert und die sedimentierten Zellen auf Objektträger ausgestrichen. Insgesamt wurden vom Blut und der eitrigen Peritonitis 33 Ausstriche sowie die entsprechenden Blindversuche untersucht (Tabelle 5).
Für die Kontrollpräparate wurde wieder Rattenblut verwendet.

TABELLE 5

Aufgliederung der untersuchten Präparate von den 8 Tieren mit den beiden Phosphatasenachweisen

Methode	Zahl der Ausstriche	
	Blut	eitrige Peritonitis
KAPLOW	6	16
GOMORI	5	6

Ergebnis V

Im Unterschied zum Tumoraszites fand sich in den Leukocyten der eitrigen Peritonitis keine histochemisch nachweisbare alkalische Phosphatase. Dieses Ergebnis ist durch mehrere Ausstriche von jedem Tier und durch die Untersuchung nach zwei Methoden gesichert. Auch im peripheren Blut konnte keine Leukocytenphosphatase dargestellt werden.

VI. MYELOISCHE LEUKÄMIE

Nur als Ergänzung der Untersuchungen von Leukocyten des peripheren Blutes prüften wir auch die myeloische Leukämie, weil entsprechend den Erfahrungen bei menschlichen Leukosen hier kein Phosphatasegehalt zu erwarten war.

Ergebnis VI

An 9 Blut- und 5 Knochenmarksausstrichen von myeloischer Leukämie der Maus konnte in den Granulocyten mit der KAPLOW-Methode kein Gehalt an alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden.

DISKUSSION

Im ersten Teil der vorliegenden Untersuchungen ergab sich an einem Material von über 450 Blutausstrichpräparaten, die mit den üblichen histochemischen Nachweismethoden der alkalischen Phosphatase in verschiedenen Modifikationen behandelt worden waren, dass in den Blutleukocyten der normalen Maus keine alkalische Phosphatase nachweisbar ist. Diese Feststellung bestätigt einzelne Literaturangaben (WACHSTEIN 55, NOWELL 32) und begründet deren im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen gemachten Hinweise. An einem grossen Untersuchungsgut, das sich auf Mäuse unterschiedlicher Provenienz und Alters erstreckt, wurde gezeigt, dass in keinem der mikroskopisch ausgewerteten Blutleukocyten Phosphatasegranula dargestellt waren.

Besonders überraschend sind die Ergebnisse des zweiten Teils der vorliegenden Untersuchungen, wo leukämieähnliche Ausschwemmungen der Leukocyten ins periphere Blut untersucht wurden. Diese leukämoiden Reaktionen wurden im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen durch Zufuhr von homologem Organeiweiss erzeugt (GEORGII 14; GEORGII, DEWES, BÜNTIG 15). Auch bei diesen Tieren, die hohe periphere Leukocytosen aufwiesen und z.T. während mehrerer Wochen untersucht wurden, gelang keine Darstellung der alkalischen Phosphatase. Ebenso waren die Leukozyten im Knochenmarksausstrich dieser Tiere phosphatasenegativ. Dieses Ergebnis ist besonders hinsichtlich der Erfahrungen in der Klinik menschlicher leukämoider Reaktionen bemerkenswert. Die leukämoiden Reaktionen können, wie einleitend ausgeführt, gerade mit Hilfe des Nachweises von alkalischer Leukocytenphosphatase häufig von echten Leukämien abgegrenzt werden.

In weiteren Untersuchungen liess sich bei der Maus auch bei hormonell induzierter Leukocytose kein Nachweis von alkalischer Phosphatase in den Blutleukocyten führen, obwohl reaktive Hyperleukocytosen mit 40 000 Leukocyten/mm^3 durch Corticoide erreicht wurden. Auch hier stehen die Versuchsergebnisse im Gegensatz zu klinischen Erfahrungen beim Menschen und zu experimentellen Feststellungen bei verschiedenen Tieren, z.B. Kaninchen (VALENTINE und Mitarbeiter 54; VACCARI, SABOTTO und MANZINI 51).

Dagegen steht das Ergebnis, dass die Blutleukocyten bei induzierten myeloischen Leukämien der Maus (GEORGII 14 a und b) phosphatasenegativ sind, in voller Übereinstimmung mit den klinisch erhobenen Befunden beim Menschen (WACHSTEIN 55, PLUM 36, WILTSHAW und MOLONEY 59, KAPLOW 22, KOCH und REMY 25, MEISLIN und Mitarbeiter 28).

Bevor die angeführten Ergebnisse näher besprochen werden, erscheint es wic-
tig, besonders auf die Gefahr hinzuweisen, eosinophile Granulocyten für phospha-
tasepositiv zu halten, ein Irrtum, dem man sehr leicht verfällt. Der Grund dafür
geht am besten aus einer Beschreibung hervor, die SCHERMER (42) von den eosinc
philen Mäuse-Leukocyten gibt: "Die Granulation ist schmutzig braunrot und so
dicht, dass die einzelnen Granula unscharf und miteinander verschmolzen erschei
nen". Diese Darstellung entspricht genau den phosphatasepositiven Stufen 1-2. De
halb ist eine sorgfältige Prüfung der Blindversuche unerlässlich, wo sich die irrtüm
lich für positiv gehaltenen Leukocyten wieder finden und als eosinophile Granulo-
cyten herausstellen.

Für die Aussagekraft unserer Feststellung, dass die Phosphatasenachweise mis
lungen sind, ist es wichtig, zu betonen, dass die angewandten Nachweismethoden
mehrfach modifiziert wurden, um eventuelle Fehlermöglichkeiten auszuschliessen
Im wesentlichen Teil der Untersuchungen stützen wir uns auf die Azofarbstoffme-
thode, die wir durch verschiedene Farbstoffe oder Puffer sowie durch Änderung der
Inkubationsart modifiziert haben. Weiter können wir die Richtigkeit der verwen-
deten Nachweismethoden damit bekräftigen, dass die im gleichen Arbeitsgang mi
untersuchten Blutausstriche der Ratte sichere Phosphatasenachweise in den Leuko-
cyten ergaben.

Im folgenden sollen die Möglichkeiten besprochen werden, die auf Grund
chemischer Eigenschaften der alkalischen Phosphatase eine Erklärung für den miss-
lungenen Nachweis der Leukocytenphosphatase bei der Maus geben könnten. Mög-
licherweise ist die alkalische Phosphatase der Mäuseleukocyten ein adaptives Fer-
ment, das von der Zelle erst im Bedarfsfall und bei Anwesenheit bestimmter Sub-
strate auf humorale oder hormonale Einwirkung hin gebildet wird (HOFFMANN-
OSTENHOF 21). Ein derartiges adaptives Verhalten der alkalischen Phosphatase
wurde beispielsweise in der Darmmucosa der Ratte beobachtet (FLOCK 10; TUBA
und ROBINSON 49). Dagegen lässt sich die Annahme einer isomeren Substratspezi-
fität der alkalischen Leukocytenphosphatase ausschliessen, weils sowohl α- als auc
ß-Phosphat als Substrat zur Inkubation angeboten wurde. Beide Substrate werden
durch alkalische Phosphatase hydrolysiert (CRAM und ROSSITER 7).

Eine weitere Erklärung für den misslungenen Phosphatasenachweis wäre, dass
die anorganische Komplemente für die Aktivierung des Fermentes im Blut der un-
tersuchten Tiere fehle. Damit sind die Mg-Ionen gemeint, die wir in entsprechen-
den Aktivierungsversuchen zugegeben und trotzdem negative Ergebnisse bekommen
haben. Andererseits könnten die Mg-Ionen durch bestimmte Stoffe verdrängt oder
gehemmt werden. Solche Hemmstoffe sind Zink oder Cyanidverbindungen und vor
allem die Phosphate selbst (HOFFMANN-OSTENHOF 21). Eine Hemmwirkung der
Phosphate konnte aber in den vorliegenden Versuchen durch eine breite Variierung
der Phosphat-Substratkonzentration sicher ausgeschlossen werden.

Ähnlich den Hemmstoffen wirken sogenannte kompetitive Inhibitoren; darunter sind Stoffe zu verstehen, die dem Substrat chemisch verwandt sind und mit diesem bei den Reaktionen in Konkurrenz treten können. Während bei den "kompetitiven Inhibitoren" der Hemmeffekt von der Substratkonzentration abhängt, hat diese bei der ebenfalls möglichen "Nichtkompetitiven Hemmung" keinen Einfluss, sondern der Hemmstoff reagiert unabhängig von ihr mit dem Ferment (HOFFMANN-OSTENHOF 21). Besonders für den bekannten Phosphatasemangel der Leukocyten bei menschlichen Leukämien diskutieren REMY und MENDE (38) die Wirkung eines derartigen Inhibitors. Deshalb nehmen sie an, bei Leukämien liege nicht ein Mangel an alkalischer Leukocytenphosphatase vor, sondern nur deren Nachweis sei unmöglich.

Von allen theoretischen Erklärungsmöglichkeiten abgesehen wird der vollständige Leukocytenphosphatase-Mangel verständlicher bei Berücksichtigung der Erfahrung, dass auch beim Menschen die überwiegende Mehrheit der segmentierten Leukocyten des Blutes phosphatasenegativ ist; es ist bekannt, dass bei gesunden Menschen in einzelnen Fällen keine Leukocytenphosphatase gefunden wird. In 43-95 % der Granulocyten findet sich im Blut gesunder Menschen keine alkalische Phosphatase (KAPLOW 22); KERPPOLA (24) gibt an, alle Blutleukocyten des Menschen seien im Regelfall phosphatasenegativ.

Der fehlende Phosphatasenachweis bei den Untersuchungen leukämoider Reaktionen und Leukocytosen nach Cortisongaben deutet auf Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies bezüglich des funktionellen Verhaltens der Leukocyten, die von mehreren Autoren wiederholt betont werden (WACHSTEIN und MEISEL 57; HAIGHT und ROSSITER 20; HOFFMANN-OSTENHOF 21). Nach TRUBOWITZ und Mitarbeiter (48) hemmt z.B. EDTA (Aethylen-Diamin-Tetra-Azetat) die alkalische Phosphatase der menschlichen Leukocyten, während die des Kaninchens unbeeinflusst bleiben. VALENTINE und Mitarbeiter (54) berichten, dass sie bei verschiedenen Tieren, beispielsweise Hunden und Katzen, keine Erhöhung des Phosphatasegehaltes der Leukocyten in "Stress-Situationen" und nach Operationen beobachten konnten wie dies bei anderen Tieren und beim Menschen der Fall ist. Auf derart unterschiedliche, artgebundene Verteilungen der Fermentaktivitäten haben besonders BUTENANDT (6) im Zusammenhang mit der Biochemie der Gene und Genwirkungen und GÖSSNER (17) bei Untersuchungen über die Phosphatase hingewiesen. Beide vermuten, dass genetische Eigenheiten für diese Unterschiede der Fermentaktivität massgeblich sind. Auch artbedingte Unterschiede in der Zusammensetzung des Eiweissanteils der Fermente sind eine Erklärungsmöglichkeit für derartige Unterschiede, die zwischen gleichen Fermenten bei verschiedener Spezies gefunden werden (ZELLER 63).

Für die genbedingte Verteilung von Fermenten sprechen auch die auffallenden familiären Unterschiede, die bei der gleichen Spezies beobachtet wurden. ZELLER (63) berichtet über Familien in Japan, bei denen weder in Blutzellen noch in Knochenmarkszellen eine Spur des Fermentes Katalase nachgewiesen werden konnte. RICHTERICH (39) weist auf beachtliche Unterschiede in der Konzentration der Le-

ber-ß Glucuronidase bei verschiedenen Mäusestämmen hin. Es ist deshalb nicht ganz auszuschliessen, dass trotz unseres vielgestaltigen Untersuchungsgutes bei anderen nicht untersuchten Mäusestämmen alkalische Phosphatase in den Leukocyten des peripheren Blutes dargestellt werden kann. Allerdings findet sich keinerlei Literaturhinweis, der über positive Nachweise alkalischer Phosphatase in den Leukocyten des peripheren Mäuseblutes berichtet.

Für die Erklärung unserer Ergebnisse lässt sich nicht feststellen, welche der genannten Möglichkeiten, der Hemmstoffe oder der kompetitiven Inhibitoren für die fehlende Nachweisbarkeit der alkalischen Leukocytenphosphatase entscheidend ist. Unsere Vermutung geht dahin, dass in den Leukocyten der untersuchten Tiere zwar eine Fermentaktivität an Phosphatasen anzunehmen ist, aber wegen der besprochenen Hemmwirkungen oder wegen zu geringer Konzentration nicht nachgewiesen werden kann. Diese Annahme stützt sich auf die Notwendigkeit von Phosphatasen für den Energiestoffwechsel in jeder Zelle, worauf besonders RICHTERICH (5) hinweist und auf die noch zu besprechenden Beobachtungen an Aszitestumormäusen. EDER (8) hob im Zusammenhang mit der Bedeutung histochemischer Fermentnachweise in der Pathologie hervor, der Verlust einer histochemischen Fermentreaktion besage nur, dass der Stoffumsatz unter der Grenze der Erfassungsmöglichkeit liegt; er muss nicht den totalen Fermentverlust mit seinen funktionellen Folgen darstellen.

Einen besonders im Anschluss an das zuletzt Besprochene sehr wichtigen Befund konnten wir an Leukocyten erheben, die im Aszitestumor von geschwulstbeimpften Mäusen schwimmen. Hier ergab sich, dass mit beiden Nachweismethoden (GOMORI und KAPLOW) eine Phosphatase-Darstellung gelingt.

Das Besondere dieser Tumoraszites-Leukocyten ist, dass sie wohl schon für längere Zeit ausserhalb des strömenden Blutes gelegen haben und schon deshalb nicht mit den Blutleukocyten gleichgesetzt werden können. Damit ergab sich die Notwendigkeit zu prüfen, ob die Leukocyten in einem unspezifischen Aszites, die im Rahmen einer Entzündung aus den Gefässen austreten und in freien Höhlen schwimmen, ebenfalls nachweisbare Mengen an alkalischer Phosphatase enthalten. Unsere Befunde an experimentell durch Bakterienzufuhr erzeugter eitriger Peritonitis haben ergeben, dass die Leukocyten dabei keine alkalische Phosphatase enthalten. Es muss demnach angenommen werden, dass bezüglich der Umgebung einwirkende Faktoren und der Zeitdauer der Faktoreneinwirkung eine mögliche Aktivitätsänderung der alkalischen Phosphatase gegeben ist. Das würde bedeuten, dass die dem Gefässsystem der Serosa oder des Peritoneums entstammenden Leukocyten erst nach längerer Zeit im Tumoraszites positiv werden.

Die Erklärung, dass durch den Aszites lokal und extraossär gebildete Leukocyten eine andere Fermentausstattung hätten, ist wenig wahrscheinlich, weil die von uns untersuchten leukämoiden Reaktionen eine nachgewiesene extraossäre Blutbildung aufwiesen und trotzdem phosphatasenegative Blutleukocyten hatten.

Aus diesen Überlegungen heraus möchten wir unsere Feststellung, dass nur in Leukocyten des Tumoraszites der Maus ein positiver Phosphatasenachweis geführt werden kann, folgendermassen erklären: Unter dem Einfluss wachsenden und sich bezüglich seines Fermenthaushaltes entscheidend verändernden Tumorgewebes (EDER und WRBA 8a) ist eine mit grundlegenden Fermentaktivitätsänderungen verbundene Aktivitätsverschiebung der alkalischen Phosphatase in den Leukocyten des Tumoraszites anzunehmen. Weiter wird die Aktivitätsänderung mit positiv nachweisbaren Phosphatasegranula aus dem Alterungsprozess der Leukocyten verständlich, dem sie während des bis zu 14 Tage dauernden Tumorwachstums ausserhalb der Gefässbahn unterworfen sind.

In den vorliegenden Literaturergebnissen finden sich aus den experimentellen Erfahrungen folgende Befunde, welche die gerade geäusserte Vorstellung unterstützen: FRANSEEN und McLEAN (11) fanden eine enge Korrelation zwischen dem Anstieg der Phosphatase im Plasma und der Phosphatase in Tumorzellen. WOODARD (60) berichtet über den Gehalt an Serumphosphatase, dass er oft stetig mit der anwachsenden Phosphatasenaktivität der Tumorzellen steigt. Es ist daher anzunehmen, dass die alkalische Plasmaphosphatase von den Tumorzellen in abnormer Menge produziert wird und von diesen in die Nachbarschaft übertritt. Der Diffusion dürften keine Schwierigkeiten im Wege stehen, da das Ferment auch physiologisch im extrazellulären Raum vorkommt (RICHTERICH 39). Ein entsprechendes Phänomen glaubt WOODARD (60) im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Fermentaktivität von normalen und neoplastischen Geweben bei benignen und malignen Riesenzellen im Knochen beobachtet zu haben. Zwar sind die Faktoren, welche ein Freisetzen von Phosphatase in die Umgebung bestimmen, noch nicht geklärt, doch könnte im Aszites aus den Tumorzellen alkalische Phosphatase austreten und in die Leukocyten übergehen, beispielsweise durch Phagocytose.

Abschliessend lässt sich feststellen, dass bei der Maus in den neutrophilen Granulocyten der Aszitesflüssigkeit von Impfgeschwülsten eindeutig alkalische Phosphatase nachgewiesen werden konnte. Dagegen gelang es bei keinem Versuchstier, auch nicht bei den Aszitestumor-Mäusen, in den Leukocyten des peripheren Blutes und des Knochenmarks einen Gehalt an alkalischer Phosphatase festzustellen. Eine Erklärung dafür zu geben, ist deshalb sehr schwierig, weil über die speziellen Funktionen der Zellphosphatasen für den Granulocytenstoffwechsel bisher nichts bekannt ist (MERKER und HEILMEYER 29). Wahrscheinlich misslingt der Fermentnachweis wegen einer zu geringen Konzentration in den Leukocyten des Mäuseblutes. Dagegen scheinen Fehler in der Nachweismethode, das Auftreten von besonderen Hemmwirkungen, isomere Substratspezifität und "adaptives Verhalten" der alkalischen Leukocytenphsophatase nicht von entscheidender Bedeutung zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG

In 491 Ausstrichen vom peripheren Blut, vom Knochenmark, von eitriger Peritonitis und von Tumoraszites wurden mit histochemischen Methoden die Leukocyten der Maus auf den Gehalt an alkalischer Phosphatase untersucht.

Als Verfahren wurden die Calcium-Cobalt-Methode und die Azofarbstoffmethode mit Variationen verwendet, die im wesentlichen im Austausch der verwendeten Farbstoffe und der Pufferlösungen bestanden.

Die Untersuchungen erfassten ein breites Spektrum von Mäusen. Neben Tieren unterschiedlichen Alters, Gewichts und Abstammung wurden solche mit Impfgeschwülsten, mit bakteriell erzeugter eitriger Peritonitis, mit experimentell erzeugten leukämoiden Reaktionen, mit experimentell erzeugten myeloischen Leukämien und nach Cortison bedingter Leukocytose untersucht.

In segmentkernigen Leukocyten des Aszites von Impfgeschwülsten konnte das Ferment alkalische Phosphatase eindeutig nachgewiesen werden.

Dagegen misslang bei allen übrigen Versuchstieren der Nachweis dieses Leukocytenfermentes. Es wird vermutet, dass der Fermentnachweis wegen einer zu geringen Konzentration in der Zelle misslingt und dass andere Gründe, wie Fehler in der Nachweismethode, Einwirkung von Hemmfaktoren oder Inhibitoren keine entscheidende Rolle spielen.

Herrn Priv. Doz. Dr. A. GEORGII danke ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. W. BÜNGELER danke ich für die grosszügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut.

SCHRIFTTUM

1. BECK, W.S. and VALENTINE, W.N.:
Biochemical studies on leucocytes; II, phosphatase activity in chronic lymphatic leucemia, acute leucemia and miscellaneous hematologic conditions.
J.Lab.clin.Med. 38 : 245-253 (1951)

2. BIESELE, J.J. and WILSON, A.Y.:
Alkaline phosphatase substrate specifities in cultured normal and malignant cells of mouse, rat and fowl.
Cancer Res. 11 : 174 (1951)

3. BOIVIN, P. et ROBINEAUX, R.:
Histochimie des cellules sanguines. II Phosphatase alcaline. Etude de la valeur localisatrice de la reaction de GOMORI appliquee aux leucocytes.
Sang 27 : 535-545 (1956)

4. BRESSEL, D.; WITTE, S. und HENNING, N.:
Die Bedeutung der alkalischen Leukocytenphosphatase bei retikulären und lymphatischen Systemerkrankungen und bei der Lymphogranulomatose.
Blut 7 : 14-26 (1961)

5. BUCKLEY, F.S.; POWELL, M.J. and GIBSON, J.G., II:
The Separation of the Formed Elements of Whole Blood by Means of Fraction I.
J.Lab.clin.Med. 36 : 29 (1950)

6. BUTENANDT, A.:
Biochemie der Gene und Genwirkungen.
Naturwissenschaften 40 : 91 (1953)

7. CRAM, D. and ROSSITER, R.J.:
Phosphatase of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
Canad.J.Res. 27 : 290 (1949)

8. EDER, M.: Histochemische Fermentnachweise. Ihre Bedeutung in der Pathologie.
Verh.dtsch.Ges.Path. 42 : 374 (1958)

8a. EDER und WRBA, H.:
Fermenthistochemische Untersuchungen zur Biologie von Aszitestumoren und ihrer Umwandlung in solide Geschwülste.
Z.Krebsforsch. 64 : 353-365 (1961)

9. FEIGIN, I. and WOLF, A.:
Artifactual nuclear staining in the GOMORI-method of demonstrating alkaline phosphatase. Differing mechanismus with the cobalt and silber visualization technics.
Laborat. Invest. 2 : 115-123 (1953)

10. FLOCK, E.V. und BOLLMANN, J.L.:
J. biol. Chem. 175 : 439 (1948)
zit. nach RICHTERICH, R.: Enzymopathologie. (Springer, Berlin/Göttingen 1958)

11. FRANSEEN, C.C. and McLEAN, R.:
Amer. J. Cancer 24 : 299 (1935)
zit. nach RICHTERICH, R.: Enzymopathologie. (Springer, Berlin/Göttingen 1958)

12. FREDRICSSON, B.:
A modification of the histochemical method for demonstration of alkaline phosphatase in which the nonspecific reactions and the diffusionphenomena are reduced.
Anat. Anz. 99 : 97-106 (1952)

13. FRIEDERICI, L.: Histochemische Methoden in der Hämatologie.
Klin. Wschr. 33 : 1020-1026 (1955)

14. GEORGII, A.: Über Wachstumsreaktionen des blutbildenden Gewebes.
Verh. dtsch. Ges. Path. 45 : 201 (1961)

14a. GEORGII, A.: Experimentelle und morphologische Untersuchungen zur Ätiologie der Säugetierleukosen.
Beitr. pathol. Anat. 124 : 183 (1961)

14b. GOERGII, A.: Über die Virusätiologie von Mäuseleukämien.
Ergebn. allg. Pathol., pathol. Anat. 42 : (1962)

15. GOERGII, A.; DEWES, H. und BÜNTIG, W.E.:
Die experimentelle Erzeugung leukämoider Reaktionen durch homologes Organeiweiss.
Klin. Wschr. 39 : 1085 (1961)

16. GOEBEL, A. und PUCHTLER, H.:
Untersuchungen zur Methodik des histochemischen Nachweises der alkalischen Phosphatase.
Zbl. Path. 92 : 159-171 (1954)

17. GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. Untersuchungen zur Methodik und vergleichenden Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren.
Z. Zellforsch., Abtl. Histochemie 1 : 48 (1958)

18. GOMORI, G.: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sectio
Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 42: 23-26 (1939)

19. GOMORI, G. and BENDITT, E.P.:
Precipitation of calcium phosphatase in the histochemical m
thod for phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 1 : 114-122 (1953)

20. HAIGHT, F.W. and ROSSITER, R.J.:
Acid and alk. phosphatase in white cells. Data for the lymph
cyte and the polymorphonuclear leucocyte of man and the
rabbit.
Blood 5 : 267-277 (1955)

21. HOFFMANN-OSTENHOF, O.:
Enzymologie. Eine Darstellung für Chemiker, Biologen und
Mediziner. XVI
(Springer, Wien 1954)

22. KAPLOW, L.S.:
A histochemical procedure of localizing and evaluation leuc
cyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and
marrow.
Blood 10 : 1023-1029 (1955)

23. KAY, H.D.: Plasma Phosphatase in Osteitis Deformans and in Other Disea
ses of Bone.
Brit. J. exp. Path. 10 : 253 (1929)

24. KERPPOLA, W.:
Obersvations on the phosphatase content of blood and bone
marrow cells in normal and pathologic hemopoiesis.
Blood 6 : 454 (1951)

25. KOCH, E. und REMY, D.:
Die alkalische Leukocytenphosphatase in der Differentialdia-
gnose hämatologischer Erkrankungen.
Klin. Wschr. 38 : 26-27 (1960)

26. LINDNER, J.; Graf v. SCHWEINITZ, A. und FREITAG, G.:
Fermenthistochemische Untersuchungen an lebenden Zellen.
Acta histochem. 8 : 478 (1959)

27. MAEDA, K. und OSHIMA, J.:
A histochemical demonstration of alkaline phosphatase in
human blood smears.
Kumamoto Med. J. 4 : 127-128 (1952)

28. MEISLIN, A.G.; LEE, S.L. and WASSERMAN, L.R.:
Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Hematopoietic Disorders.
Cancer 12 : 760-766 (1959)

29. MERKER, H. und HEILMEYER, L.:
Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukocyten.
Dtsch.med.Wschr. 7 : 253-257 (1960)

30. MEYER, R.H. and WILLIAMS, W.L.:
Alkaline phosphatase activity in normal and injured livers of mice.
Anat.Rec. 119 : 289-303 (1954)

31. NEUMANN, K.:
Über histochemisch-quantitative Phosphatasebestimmung.
Verh.anat.Ges. (Erg.-H.z.Bd. 97 Anat.Anz.) : 165 (1951)

32. NOWELL, P.C.; COLE, L.J.; HABERMEYER, I.G. and ROAN, P.L.:
Growth and Continued Function of Rat Marrow Cells in X-radiated Mice.
Cancer Res. 16 : 258-261 (1956)

33. PAWLOWSKY, A.D.:
Beiträge zur Ätiologie und Entstehungsweise der akuten Peritonitis.
Virchows Arch. 117 : 469 (1889)

34. PEARSE, A.G.E.:
Histochemistry (Theoretical and Applied).
(J.& A.Churchill LTD., London 1953)

35. PLENERT, W.: Methodische Studien zur Cytochemie der Leukocytenphosphatasen. I. Einfluss von Fixierung und Metallionen auf die Aktivität der alk. Leukocytenphosphatasen in Blutausstrichen.
II. Der Einfluss einiger Hemmstoffe und verschiedener org. Verbindungen auf die Aktivität der alk.Leukocytenphosphatase.
Z. Zellforsch. Abtl.Histochem. 1 : 171-184 (1959)

36. PLUM, C.M.: Die alkalische Phosphatase in den Zellen des normalen und pathologischen Knochenmarks und des peripheren Blutes.
Acta haemat. 4 : 73-80 (1950)

37. RABINOVITCH, M. und ANDREUCCI, D.:
A histochemical study of "acid" and "alkaline" phosphatase distribution in normal human bone marrow.
Blood 4 : 580-594 (1949)

38. REMY, D. und MENDE, H.-J.:
Über Eigenschaften leukämischer Blutzellen. III. Phosphatase-aktivität der Leukämiezellen.
Ärtzl.Forsch. 11 : 389 (1957)

39. RICHTERICH, R.:
Enzymopathologie.
(Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1958)

40. ROCHE, J.: Blood - Phosphatases.
Biochem.J. 25 : 1724 (1931)

41. SAUER, H. und RAUSCH-STROOMANN, J.G.:
Über die alkalische Leukocytenphosphatase bei der Polycythaer
Dtsch.Arch.klin.Med. 202 : 282 (1955)

42. SCHERMER, S.:
Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere.
(Joh.Ambrosius Barth, Leipzig 1954)

43. SKJERVEN, O.:
A critical examination of the GOMORI method for alkaline pho
phomonoesterase.
Acta endocrin., Kbh. 14 : 52-60 (1953)

44. SPEAR, F.: Separation of Leucocytes from Whole Blood by Flotation on Gum Acacia.
Blood 3 : 1055 (1948)

45. SZILARD, P.: Eine Methode zur isolierten Gewinnung der weissen Blutkörperchen.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 211 : 597 (1926)

46. TAKAMATSU, H.:
Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase; histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben.
Tr.Soc.path.japan. 29 : 492 (1939)

47. TAKEUCHI, T. and UTSUNOMIYA, S.:
Sensitivity of the cytochemical demonstration of alkaline and acid phosphatases in blood cells.
Acta path.jap. 2 : 57-63 (1952)

48. TRUBOWITZ, S.; FELDMAN, D.; BENANTE, C. and KIRMAN, D.:
Metal requirements of alkaline phosphatases of human and rabbit leukocytes.
Proc.Soc.exp.Biol.&Med. 95 : 35-38 (1957)

49. TUBA, J. und ROBINSON, M.I.:
J.biol.Chem. 203 : 947 (1953)
zit. nach RICHTERICH, R.: Enzymopathologie. (Springer, Berlin 1958)

50. UMENO, M.: Studien über Phosphatase; über die Glycerophosphatase der Leukocyten im Blute.
Biochem.Ztschr. 231 : 339 (1931)

51. VACCARI, F.; SABOTTO, B. and MANZINI, E.:
Alkaline Phosphatase Activity of Leukocytes in Shock.
Blood 10 : 730 (1955)

52. VALENTINE, W.N. and BECK, W.S.:
Biochemical studies on leucocytes; I. phosphatase activity in health, leucocytosis and myelocytic leucemia.
J.Lab.clin.Med. 38 : 39-55 (1951)

53. VALENTINE, W.N.; BECK, W.S.; FOLLETTE, J.H.; MILLS, H. and LAWRENCE, J.S.:
Biochemical studies in chronic myelocytic leukemia, polycythemia vera and other idiopathic myeloproliferative disorders.
Blood 7 : 959-977 (1952)

54. VALENTINE, W.N.; FOLLETTE, J.H.; HARDIN, E.B.; BECK, W.S. and LAWRENCE, J.S.:
Studies on Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity: Relation to "Stress" and Pituitary- Adrenal Activity.
J.Lab.clin.Med. 44 : 219 (1954)

55. WACHSTEIN, M.:
Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells.
J.Lab.clin.Med. 31 : 1-17 (1946)

56. WACHSTEIN, M.:
Histochemistry of leukocytes.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 59 : 1052-1065 (1955)

57. WACHSTEIN, M. and MEISEL, E.:
The histochemical distribution of 5-nucleotidase and unspecific alkaline phosphatase in the testicle of various species and in two human seminomas.
J.Histochem.Cytochem. 2, 137-148 (1954)

58. WALLGREEN, A.:
Experimentelle Untersuchungen über peritoneale Infektion mit Streptokokken.
Beitr.path.Anat. 25 : 206 (1899)

59. WILTSHAW, E. and MOLONEY, W.C.:
Histochemical and biochemical studies on leukocyte alkaline phosphatase activity.
Blood 10 : 1120-1131 (1955)

60. WOODARD, H.Q.:
Quantitative studies of ß-glycerophosphatase activity in normal and neoplastic tissues.
Cancer 9 : 352 (1956)

61. YASUDA, K.; IHJIAMA, S. and KOSHIKAWA, Y.:
The inhibitory reaction of some drugs on the activity of the alkaline phosphatase, demontrated by histochemical method.
II. Inhibitory reaction of isatin,
Okajiamas fol. anat. jap. 29 : 317-324 (1957)

62. YASUDA, K.; IHJIAMA, S.; KOSHIKAWA, Y. and WATANABE, H.:
The inhibitory reaction of some drugs on the activity of the alkaline phosphatase, demonstrated by histochemical method.
III. Inhibitory reaction of ninhydrin.
Okajiamas fol. anat. jap. 30 : 1-12 (1957)

63. ZELLER, E.A.: Handbuch der Allgemeinen Pathologie. II/1 279 (Springer, Berlin/Heidelberg) 1955

LEBENSLAUF

Geboren am 24. März 1937 in München als erstes von zwei Kindern des Zollrates Peter Goldbrunner und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Wasner. Volksschule von 1943-1948 wegen Zerstörung der Wohnung in Wörleschwang (Schwaben). Von 1948-1950 Humanistisches Gymnasium Kloster Scheyern (Obb.). Nach Rückkehr des Vaters aus Kriegsgefangenschaft Besuch des Humanistischen Wilhelmsgymnasiums in München mit Ablegung der Reifeprüfung im Sommer 1956.

Im Herbst 1956 Beginn des Medizinstudiums in München. Im Februar 1959 ärztliche Vorprüfung. Klinisches Studium ebenfalls in München. Famulaturen auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Lindau/Bodensee sowie auf der Urologie- und Anaesthesieabteilung der Chirurgischen Universitätsklinik in München. Seit Februar 1960 am Pathologischen Institut. Arbeit an der Dissertation. Nebenbei in den Semesterferien Famulatur im Sektionssaal. Zwei Semester Tätigkeit als Koassistent am Anatomischen Institut. Ablegung der ärztlichen Prüfung am 6. Sept. 1962.